



بررسی تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMT در گاوهاي نژاد هلشتاين با تکنيک PCR-SSCP

مهندی وفای واله^۱ و سجاد شهدادی ساردو^۲

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، داشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، (نویسنده مسؤول: mehdi.valleh@uoz.ac.ir)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، داشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۴

صفحه: ۱۱۲ تا ۱۱۴

چکیده

ژن‌های خانواده DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) بواسطه نقش کلیدی در شکل‌گیری و ابقاء الگوهای اپی‌ژنتیکی، اهمیت بالایی در کنترل تکوین و رشد و نمو جنینی از مرحله لقاح تا دوران پس از تولد دارند. مطالعه حاضر به منظور شناسایی جهش‌های بالقوه در آگزون ۳۳ ژن-1 DNMT-3a، آپیتررون ۴ ژن DNMT-3b و آپیتررون ۳ ژن DNMT-3b و ارتیترون ۶۰ رأس گاو هلشتاين دارای رکورد وزن تولد تا بلوغ از یک گاوداری صنعتی در استان کرمان انجام شد. استخراج نمونه‌های DNA با استفاده از روش فلکلروفرم انجمام گرفت و جایگاه‌های هدف با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسعه و اکتشافی پلیمیزر (PCR) تکثیر شدند. به منظور رذیابی چندشکلی در توالی‌های هدف از تکنیک چندشکلی ساختار فضایی رشتہ‌های منفرد (SSCP) و رنگ‌آمیزی با نیترات‌نقره استفاده شد. نتایج این مطالعه حاکی از عدم وجود چهش در تمام نمونه‌های مورد بررسی، بر اساس اندازه قطعه مورد بررسی، الگوی باندی یکسانی شناسائی شد. عدم شناسائی وجود چندشکلی در نواحی مورد بررسی، احتمالاً ممکن است به دلایل نظری ناکارآمدی نسبی تکنیک PCR-SSCP در شناسائی جهش‌ها، کوچکبودن اندازه نمونه‌های مورد بررسی، پیامدهای تصادفی ناشی از رانش ژنی و یا طبیعی بر علیه وقوع چهش در نواحی مزبور باشد. بنابراین، نواحی ژنی مورد بررسی در این تحقیق به عنوان نشانگر مولکولی برای ارزیابی صفت وزن تولد در گاوهاي هلشتاين فاقد کارائی هستند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گاو هلشتاين ایران، DNMTs

متیلاسیون در طی فرآیند همانندسازی را در رشتہ‌های جدید DNA دارند (۸). پژوهشگران همچنین گزارش کردند، ژن‌های DNMT3a و DNMT3b نه تنها در فرآیند تشکیل الگوهای اپی‌ژنتیکی اسپرم و یا تخمک در طی فرآیند گامتوژنر دخالت دارند (۱۲،۲۹،۳۵)، بلکه نقش بسزایی در ایجاد الگوهای جدید اپی‌ژنتیکی در طول فرآیند برنامه‌ریزی مجدد الگوهای اپی‌ژنتیکی ژنوم در طول دوران پس از لقاح ایفاء می‌کنند (۱۳،۲۹). از طرف دیگر، نتایج تحقیقی نشان داد که ژن‌های اعضای خانواده DNMTs نقش مهمی در کنترل تکوین و نیز کنترل مراحل مختلف رشد جنینی در پستانداران دارند (۱۱،۲۴). در این رابطه نشان داده شده است که اختلال در میزان بیان هریک از ژن‌های-1-1, DNMT3a و DNMT3b منجر به بروز اختلال در لانه‌گزینی رویان، تکوین جفت، سقط جنین پس از لانه‌گزینی و مردزائی می‌شود (۱۱،۱۶،۳۵). پژوهشگران همچنین گزارش کردند که اختلال در عملکرد فعلیت ژن‌های DNMTs در الگوهای متیلاسیون و نیز الگوی بیان ژن‌های ایمپرینت، نظری ژن‌های IGF2 و H19 که نقشی کلیدی در کنترل فرآیند تکوین جنین و جفت در دوران قبل از تولد دارند، اثرات معنی‌داری می‌گذارند (۱۶،۷،۲۳،۳۵).

محققان گزارش کردند که سطح بیان DNMT3a و یا DNMT3b با صفاتی مانند کیفیت گوشت و صفات لشه (۱۴،۲۵)، میزان بیان سیتوکین‌های التهابی در بافت چربی (۱۹) و نیز میزان حساسیت و یا مقاومت به بیماری‌ها از جمله بیماری مارک (Marek Disease) در پرنده‌گان (۳۴) ارتباط

مقدمه

با وجود یکسان‌بودن توالی ژنومی در سلول اولیه تخم و سلول‌های مختلف حاصل از آن، تنوع الگوی بیان ژنی در این سلول‌ها، پایه و اساس فرآیند تکوین است که با تغییر تدریجی الگوی اپی‌ژنتیکی سلول‌ها در طی مراحل جنین‌زادی شکل می‌گیرد (۸،۱۲،۳۵). از جمله تغییرات اپی‌ژنتیکی که در سلول‌های تمایزیافته به طور پایداری قابلیت توارث دارد فرآیند متیلاسیون DNA است که در پیدایش اندامها و بافت‌های مختلف جنین در حال تکوین نقش بسزایی دارد (۲۴،۱۶،۲۹). متیلاسیون کرین ۵ نوکلوتیدی سیتوزین در مناطق دارای دی‌نوکلوتیدهای CPG به منظور تولید ۵-متیل‌سیتوزین، یکی از مدیفیکاسیون‌های اصلی اپی‌ژنتیک می‌باشد. سیتوزین متیله‌شده در شیار بزرگ مارپیچ دو رشتہ‌ای DNA قرار می‌گیرد که در روند اتصال فاکتورهای رونویسی تداخل کرده و بیان ژن‌ها را مهار می‌کند (۱۳،۲۹). الگوهای متیلاسیون در طول دوره جنبی ایجاد شده و از طریق میتوуз به ارتقی می‌رسند. متیلاسیون DNA دارای نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های ایمپرینت و ژن‌های دارای الگوی بیان وابسته به جنس که نقش تعیین‌کننده‌ای در فرآیند تکوین و نیز کنترل وزن جنین دارند، می‌باشد (۷،۱۱،۱۶،۳۵). الگوهای اپی‌ژنتیکی همچنین نقشی کلیدی در خاموش‌کردن ترانسپوزن‌ها دارند. در این رابطه پژوهشگران گزارش کردند که اعضای خانواده ژن‌های DNMTs به ترتیب شامل ژن DNMT-1 مسؤولیت حفظ الگوهای متیلاسیون و در مقابل ژن‌های DNMT-3a و DNMT-3b نقشی کلیدی در شکل‌گیری الگوهای جدید

پژوهش حاضر، شناسایی تنوع ژنتیکی در ژن‌های DNMT1 و DNMT3b و DNMT3a در گاوها هلشتاین به کمک تکنیک PCR-SSCP بود.

مواد و روش‌ها

تئهیه نمونه‌های خون

در این تحقیق، تعداد ۶۰ رأس گاو هلشتاین در گلهای واقع در استان کرمان که با سیستم پرورشی صنعتی نگهداری می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. خونگیری به صورت تصادفی از ورید گردن در لوله‌های حاوی ماده خدالعقاد EDTA انجام شد. نمونه‌ها پس از شماره‌گذاری سریعاً داخل طرف حاوی بخ فراوان قرار گرفتند و مستقیماً به فریزر با دمای ۲۰–۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از خون کامل توسط روش فنل کلروفرم مشابه روش شریعت و همکاران (۳۲) انجام شد. کیفیت نمونه‌های DNA توسط روش الکتروفوروز بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

طراحی آغازگرها

تولی آغازگرها با استفاده از نرمافزار Primer Premier نسخه ۶ طراحی (جدول ۱) و بهوسیله سایت Ncbi Blast از یکسان‌بودن محل جفت‌شدن آغازگرها اطمینان حاصل شد و بهمنظور سنتز به شرکت پیشگام تهران ارسال شدند.

دارد. از طرفی تغییر الگوی بیان ژن‌های اعضای خانواده DNMTs از جمله دلایل مشترک در بروز انواع سرطان‌ها می‌باشد (۳۱، ۳۲).

بنابراین با توجه به نقش کلیدی ژن‌های خانواده DNMTs در شکل‌گیری و ابقاء الگوهای متیلاسیون در طی فرآیند گامتوزیس، دوره پس از لفاح و با توجه به نقش کلیدی آن‌ها در کنترل طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی و به‌طور خاص فرآیندهای مربوط به رشد و تکوین جنین (۱۶، ۳۵)، بنابراین چندشکلی احتمالی در این ژن‌ها احتمالاً بر وزن گوساله در زمان تولد نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد (۱۶، ۳۵). با توجه به ارزش اقتصادی وزن تولد، این صفت به عنوان یک صفت مهم در اهداف اصلاحی مطرح می‌باشد (۶، ۲۷، ۱۸، ۳۰). محققان گزارش کردند که وزن گوساله متولدشده بر عملکرد صفات تولیدی و تولیدمشی مؤثر است، بطوریکه نتایج تحقیقات دلالت بر وجود همبستگی مثبت معنی‌داری بین وزن تولد و میزان نرخ رشد در بلندمدت (حتی تا سن ۸ سالگی) دارد (۳۶). از طرف دیگر، یکی از دلایل عدمی سخت‌زایی، نامتناسب‌بودن جثه گاو ماده (جثه کوچک) با اندازه جثه گوساله (که تا حدود زیادی با وزن تولد مرتبط است) می‌باشد (۲۷، ۳۰)؛ در این رابطه گزارش شده است که به ازاء افزایش هر کیلوگرم وزن گوساله‌ی تازه متولدشده، سخت‌زایی حدود ۱۳ درصد افزایش می‌یابد (۱۸). بنابراین، با توجه به اهمیت ژن‌های خانواده در کنترل فرآیند تکوین جنین در دوران آبستنی، هدف از

جدول ۱- پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر نواحی هدف در ژن‌های DNMTs

Table 1. Designed primers for amplification of target region in the DNMTs genes

نام ژن	توالی آغازگرهای رفت و برگشت	تعداد جفت باز تکثیر شده	کد پیگیری در بانک ژن
DNMT-1	F: 5'-CCACCGGTGTTCACAGAGGACTG-3' R: 5'-CGCACAGCATTCCACATCTCC-3'	114bp	NM_182651.2
DNMT-3a	F: 5'-TCTGGTGAGAGGAACGGTAGGA-3' R: 5'-GACTTGGAAAGCAGGGACCTTGAC-3'	176bp	AC_000168.1
DNMT-3b	F: 5'-CACAGAGGAGGTTCAAGAGAT-3' R: 5'-ATTCAGGTCAATTATCAGGACTG-3'	207bp	AC_000170.1

آزمون چندشکلی ساختار فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)

بهمنظور شناسایی تنوع ژنتیکی، محصولات PCR به کمک روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)، بر اساس پروتکل‌های توسعه‌یافته با اندکی تغییرات ارزیابی شدند (۱). برای این منظور، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۰ میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SSCP مخلوط شد و برای مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموماسایکلر با دمای ۹۵°C واسرشتسازی شدند. نمونه‌های واسرشتسازده در کمترین زمان ممکن روی بخ انتقال یافتند تا از به هم چسبیدن رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید. بهمنظور نمایان‌سازی ژنتیک‌ها از تانک الکتروفوروز عمودی و ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد استفاده شد. سپس الکتروفوروز نمونه‌ها با ولتاژ ۱۸۰ ولت

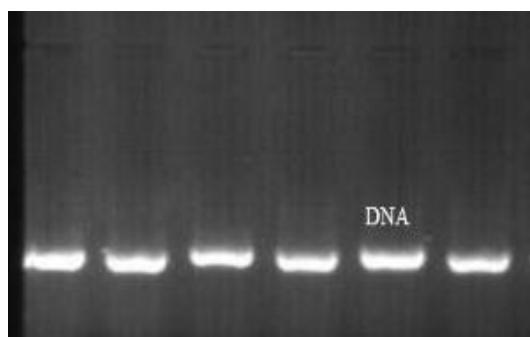
مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) واکشن PCR مطابق با پروتکل‌های بهینه‌سازی شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر؛ به این صورت که ۱۲ میکرولیتر Master Mix ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (رفت و برگشت)، ۲ میکرولیتر DNA و ۹ میکرولیتر آب دوار تقطیر در دستگاه ترموماسایکلر مدل اپندرف ساخت آمریکا انجام شد.

شرایط دمایی PCR بهمنظور تکثیر نواحی مورد نظر شامل یک مرحله واسرشتسازی اولیه برای مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۰°C و ۳۸ چرخه شامل سه مرحله: مدت زمان ۴۵ ثانیه با دمای ۹۴°C، دمای اتصال [۶۰°C] به مدت ۴۵ ثانیه برای ژن DNMT-1 (DNMT-1-6۳°C)، DNMT-3a برای ژن‌های DNMT-3b به مدت ۴۵ ثانیه]] و مدت زمان ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه]] و مدت زمان ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲°C و یک چرخه بسط نهایی ۷۲°C به مدت ۱۵ دققه اعمال شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از استخراج نمونه‌های DNA
استخراج نمونه‌های DNA با روش فنل کلروفورم منجر به حصول مقداری بالایی از DNA ژنومی شد که به صورت تک‌باند و بدون هرگونه تکثیر غیراختصاصی بودند (شکل ۱).

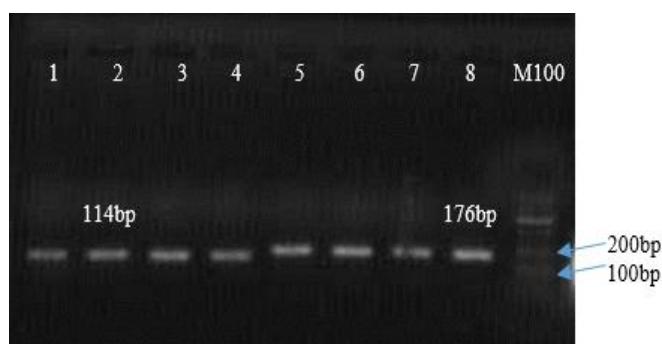
به مدت ۶ ساعت در دمای ۴۰°C انجام گرفت. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل جهت مشاهده الگوهای باندی بهروش نیترات‌نقره به ترتیب در سه مرحله ثبت، لکه‌گذاری و ظهور انجام شد (۱).



شکل ۱- کیفیت DNA‌های استخراج شده از نمونه خون گاو هلشتاین روی ژل آگارز یک درصد
Figure 1. Quality of extracted DNA from blood samples of Holstein cow on a 1% agarose gel

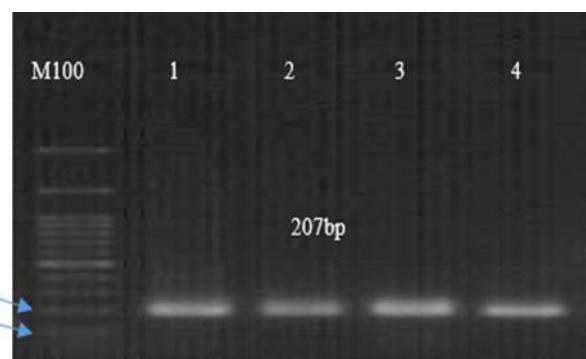
پلی‌مراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بدون تکثیر باند غیراختصاصی انجام گرفت. نشانگر وزن مولکولی استفاده شده در کنار محصولات PCR صحت تکثیر قطعات مورد نظر را تأیید کرد.

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)
پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، تکثیر قطعه ۱۱۴ جفت‌بازی از ژن ۱-DNMT-1، قطعه ۱۷۶ جفت‌بازی از ژن a-DNMT-3a (شکل ۲) و قطعه ۲۰۷ جفت‌بازی مربوط به ژن b-DNMT-3b (شکل ۳) به وسیله واکنش زنجیره‌ای



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR برای ژن‌های ۱-DNMT-1 (لاین‌های شماره ۱ تا ۴) و a-DNMT-3a (لاین‌های شماره ۵ تا ۸) روی ژل آگارز

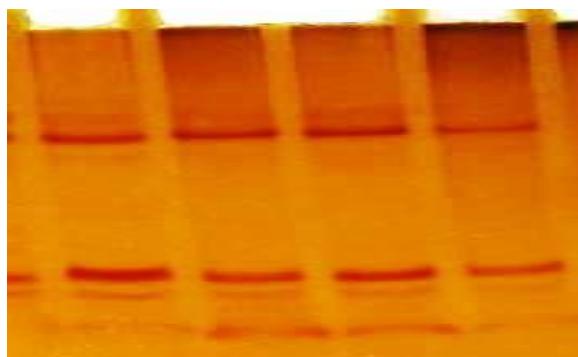
Figure 2. Agarose electrophoresis patterns of PCR-amplified fragments of DNMT-1 DNMT3a (lanes 5-8) genes (lanes 1-4)



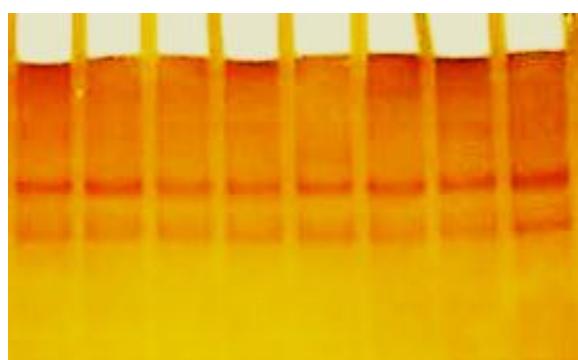
شکل ۳- نقوش الکتروفورزی مخصوصات PCR برای ژن DNMT-3b بر روی ژل آگاراز
Figure 3 . Agarose electrophoresis patterns of PCR-amplified fragments of DNMT3b gene

چندشکلی در نواحی زنی مورد بررسی در جمیعت گاو هلشتاین مورد ارزیابی در این مطالعه داشت؛ بطوریکه برای هر یک از جایگاههای مورد بررسی الگوهای باندی مشابهی شناسائی شد (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).

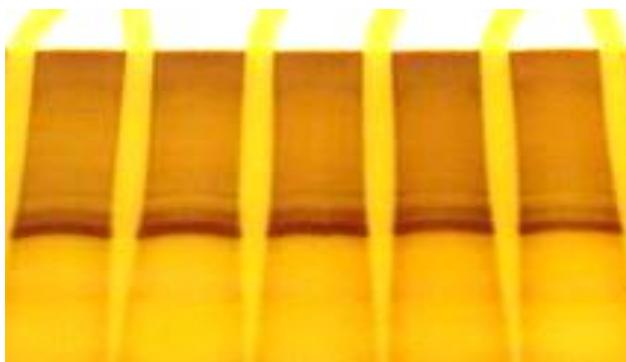
نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ با روش SSCP پس از تکثیر قطعات مورد نظر، از روش SSCP جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی وجود چندشکلی در اکترون ۳۳ ژن ۱ DNMT1، ایتررون ۴ ژن DNMT3a و ایتررون ۳ ژن DNMT3b حاکی از عدم وجود



شکل ۴- الگوهای یکشکل PCR-SSCP نمایان شده بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اکترون ۳۳ ژن ۱ DNMT1
Figure 4. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the exon 33 region of the DNMT1 gene on the 10% polyacrylamide gel



شکل ۵- الگوهای یکشکل PCR-SSCP نمایان شده بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه ایتررون ۴ ژن ۳a DNMT3a
Figure 5. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the intron 4 region of the DNMT3a gene on the 10% polyacrylamide gel



شکل ۶- الگوهای یکشکل PCR-SSCP نمایان شده بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اینtron ۳ ژن DNMT-3b
Figure 6. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the introns 3 region of the DNMT3b gene on the 10% polyacrylamide gel

تکنوکلئوتیدی شناسائی شده با صفات لاشه از جمله رنگ و میزان چربی گوشت، وضعیت دندنهای، بازده لاشه و ضخامت چربی پشت بدن در ارتباط بودند (۲۵). بطور مشابه ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs در نژاد گاو دلالت بر ارتباط معنی‌دار برخی از جهش‌های شناسائی شده با صفات لاشه داشت؛ بطوطریکه از میان ۱۰ جهش شناسائی شده تنها جهش‌های واقع در اگزون شماره ۱۷ ژن DNMT1 (13154420A>G) و جهش واقع در اینtron شماره ۱۱ ژن DNMT3a (76198537A>G) و جهش واقع در اینtron شماره ۱۰ ژن DNMT3b (63037313C>T) با برخی از صفات لاشه ارتباط معنی‌داری داشتند (۲۶). بعلاوه نتایج تحقیقات سایر محققان دلالت بر ارتباط بین الگوی بیان ژن‌های b DNMT3a/b با صفات اقتصادی و نیز صفات لاشه در گاو گوشتش دارند (۱۴).

اگرچه تاکنون ارتباط چندشکلی‌های اعضاي ژن‌های خانواده DNMTs با وزن تولد و صفات رشد در مدل‌های حیوانی گزارشی ارائه نشده است؛ اما نتایج مطالعات پژوهشگران در سال‌های اخیر دلالت بر اهمیت توارث فرا نسلی الگوهای اپی‌ژنتیکی در کنترل طیف گستردگی از صفات اقتصادی در حیوانات اهلی در نسل‌های آتی دارد (۱۲،۲۵). در این رابطه بطور خاص نقش ژن‌های خانواده DNMTs در مدل‌های مختلف حیوانی به اثبات رسیده است (۱۴،۲۴،۳۵). بعلاوه اهمیت کلیدی این ژن‌ها در شکل‌گیری الگوهای ایمپرینت ژنومی، که نقشی کلیدی در کنترل فرآیند تکوین در دوران جنینی، کنترل وزن تولد، قابلیت زنده‌مانی و نیز وقوع سخت‌زائی دارد، در مدل‌های مختلف انسان و حیوان به اثبات رسیده است (۲۷،۱۶،۲۴،۳۵). در این رابطه نتایج طیف گستردگی از مطالعات دلالت بر ارتباط بین تغییر الگوی بیان ژن‌های خانواده DNMTs با میزان متیلاسیون ژن‌های ایمپرینت (ژن‌های موثر در رشد و تکوین در دوران جنینی) بر تکوین و عملکرد جفت (پلاستتا) دارد (۲۴،۱۶،۳۵).

صرف‌نظر از محدودیت یافته‌های ارائه شده مرتبط با مدل‌های حیوانی؛ نتایج طیف گستردگی از مطالعات اپیدمیولوژیکی دلالت بر وجود ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی‌های موجود در ژن‌های خانواده DNMTs با احتمال قوع طیف گستردگی از بیماری‌ها دارند. در این رابطه نتایج

از دلایل احتمالی برای توجیه این نتایج می‌توان به تفاوت روش مورد استفاده برای شناسائی جهش در این مطالعه (PCR-SSCP) و مطالعات سایر محققان (عدم تأیین توالی)، کوچک‌بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و یا اثرات احتمالی مرتبط با استراتژی‌های اصلاحی (کنترل آمیزش‌ها) مورد استفاده در گله مزبور اشاره کرد. در این رابطه نشان داده شده است که بکارگیری برخی از استراتژی‌های اصلاحی می‌تواند منجر به افزایش سطح روابط خویشاوندی بین افراد جامعه و نیز گاه‌آن تثبیت برخی ژن‌ها (راش ژنی) در سطح جامعه شود (۲۲). از دیگر عوامل مؤثر بر عدم وجود تبع در جایگاه‌های مورد بررسی می‌توان به اثر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در جایگاه‌های مورد بررسی اشاره کرد، هر چند برای تایید این فرضیه‌ها می‌باشد احتمال وقوع جهش‌های مزبور در سایر نژادها و نیز جمعیت‌هایی با اندازه بزرگ نیز بررسی شود. علاوه‌بر این، در تحقیق حاضر از تکنیک SSCP استفاده شد. روش SSCP بخاطر دقت بالا در تشخیص جهش‌های ناشناخته و نیز ارزان‌بودن نسبت به سایر روش‌های شناسائی جهش دارای مطلوبیت بالایی می‌باشد (۱۷،۲۱،۳۳). با این وجود محققان گزارش کردند که قابلیت شناسایی جهش‌های ناشناخته با استفاده از روش SSCP برای قطعات با طول کمتر از ۳۰۰ جفت‌باز، بالاتر از ۸۰ درصد می‌باشد (۱۷،۲۱).

در خصوص وجود تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs و نیز تأثیر احتمالی آنها بر عملکرد حیوانات اهلی حیوانات اهلی گزارشات اندکی ارائه شده است؛ بطوریکه عمدۀ نتایج تحقیقات ارائه شده در خصوص تأثیر تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs بر مدل‌های انسانی تمرکز دارند. به طور خاص، ارزیابی ارتباط چندشکلی‌های تکنولوژی‌دی ژن DNMT3b با کیفیت گوشت و صفات لاشه در گاو گوشتشی چنی نژاد Snow Dragon با استفاده از نشانگر PCR-RFLP منجر به شناسائی سه ژنوتیپ TT، CT و CC، سه ژنوتیپ C (C63029349T)، سه ژنوتیپ GG، AG و AA برای چندشکلی واقع در اینtron شماره ۶ (G63032883A)، سه نوع ژنوتیپ AA، AG، GG برای چندشکلی واقع در اینtron شماره ۱۳ (A63039420G) شد؛ بطوریکه چندشکلی‌های

احتمال وقوع سرطان سینه و یا کولورکتال مرتبط بود (۳۶، ۳۷). همچنین نتایج تحقیقات محققان حاکی از بالاتر بودن ضربی هوشی افراد دارای جهش در موقعیت DNMT3L در ۱۱۳۰C>T (rs7354779) در مقایسه با سایر افراد داشت؛ هرچند ارتباطی بین تنوع ژنتیکی مشاهده شده در ژن‌های DNMT1، DNMT3a، DNMT3b و DNMT3L وجود نداشت (۱۵).

در این تحقیق تمامی الگوهای باندی به دست آمده برای جایگاه‌های ارزیابی شده ژن‌های DNMT1، DNMT3a و DNMT3b در جمعیت گاو هلشتاین مورد بررسی، بسته به جایگاه مورد ارزیابی دارای الگوی باندی تکشکل (مونومرف) بودند؛ لذا جایگاه‌های مورد مطالعه احتمالاً نمی‌توانند به عنوان نشانگر مناسب برای ارزیابی هیچکدام از صفات مورد مطالعه در گاو هلشتاین مورد استفاده قرار گیرند. از دلایل احتمالی توجیه کننده این نتایج می‌توان به دلایلی همچون اثرات پدیده رانش‌زنی، ناکارآمدی نسبی تکنیک PCR-SSCP در شناسائی جهش‌ها، کوچک‌بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و یا تأثیر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در جایگاه‌های مورد بررسی اشاره نمود. از طرف دیگر، با توجه به نقش کلیدی این ژن‌ها در کنترل تمایز سلولی، کنترل میزان بیان ژن‌ها و نیز کنترل فرآیند تکوین جنبن در دوران قبل از تولد و حتی رشد و نمو در دوران پس از تولد؛ و با توجه به تحقیقات اندک در رابطه با شناسایی و نیز ارتباط تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs و صفات مهم اقتصادی در حیوانات اهلی، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر بر روی سایر نواحی ژن‌های فوق الذکر در جمعیت‌های بزرگ‌تر و دیگر نژادها صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل (UOZ-GR-9517-35) انجام شده است.

یک مطالعه حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار وابسته به سن بین C46359T(-149C--)(DNMT3b) با میزان وقوع کارسینوم سر و گردن (انواع سرطان‌های ناحیه سر و گردن) و نیز میزان قابلیت زنده‌مانی بیمار داشت (۹). همچنین نتایج مطالعات حاکی از تأثیر معنی‌دار جهش در ناحیه پروموتور (G>T) ژن DNMT3b بر افزایش میزان خطر ابتلا به سرطان مری داشت، بطوريکه احتمال وقوع سرطان مری در افراد حامل آلل G در مقایسه با افراد حامل آلل T بالاتر بود (۱۰). نتایج تحقیقات پژوهشگران همچنین حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار بین احتمال وقوع سرطان کولورکتال (سرطان روده بزرگ) با چندشکلی واقع در پرموتور ژن (G39179T; rs1569686) داشت، DNMT3b بطوريکه نزدیک ابتلا به سرطان در افراد دارای ژنتیک TT در مقایسه با ژنتیک‌های GT و GG بطور معنی‌داری بالاتر بود (۱۱).

نتایج تحقیقات پژوهشگران همچنین حاکی از ارتباط بین فقط یکی از چندشکلی‌های شناسائی شده در ژن‌های اعصابی خانواده DNMTs با شناس ابتلا به بیماری نقرس دارد؛ بطوريکه تنها چندشکلی شناسائی شده واقع در ناحیه کدکننده ژن DNMT1 (rs2228611) با احتمال وقوع بیماری نقرس ارتباط داشت، در مقابل چندشکلی‌های شناسائی شده واقع در نواحی غیرکدکننده ژن‌های DNMT3a (rs1550117) و DNMT3b (rs2424913) تأثیری روی شناس ابتلا افراد به نقرس نداشت (۱۲). علاوه بر این اگرچه نتایج مطالعات پژوهشگران حاکی از ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی واقع در ناحیه کدکننده ژن DNMT1 (rs16999593) با نزدیک ابتلا به الیگواسپرمی (کمبود اسپرماتوزوئید در مایع منی) داشت (۱۳)، اما در مقابل هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین جهش‌های شناسائی شده در نواحی مختلف این ژن، (Ile311Val، His97Arg، Ala147Gly) و احتمال وقوع سرطان کولورکتال (sporadic colorectal cancer) مشاهده نشد (۱۴). در مقابل نتایج برخی از پژوهش‌های دیگر انجام شده بر روی ارزیابی تأثیر وقوع جهش در ژن‌های خانواده DNMTs بر احتمال وقوع بیماری، منجر به شناسائی چندین جهش در نواحی کدکننده (اگزون) و نیز غیرکدکننده (اینtron) این ژن‌ها

منابع

- Akbari, H., G. Dashab, M. Vafaye Valleh. 2018. Exploration of MEG9 gene polymorphism and its association with birth weight in Sistani cattle. *Research on Animal Production*, 8(17): 194-200.
- Binisziewicz, D., J. Gribnau, B. Ramsahoye, F. Gaudet, K. Eggan, D. Humpherys and R. Jaenisch. 2002. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting and embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 22(7): 2124-2135.
- Bolygon, A.A., M.E.Z. Mercadante, S. Forni, R.B. Lobo and L.G.D. Albuquerque. 2010. Covariance functions for body weight from birth to maturity in Nellore cows. *Journal of Animal Science*, 88(3): 849-859.
- Cheng, P., H. Chen, R.P. Zhang, S.R. Liu and A. Zhou-Cun. 2014. Polymorphism in DNMT1 may modify the susceptibility to oligospermia. *Reproductive Biomedicine Online*, 28(5): 644-649.
- Daraei, A., R. Salehi and F. MohamadHashem. 2011. DNA-methyltransferase 3B 39179 G> T polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in a subset of Iranian population. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 16(6): 807.
- Dawson, W.M., R.W. Phillips and W.H. Black. 1947. Birth weight as a criterion of selection in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 6(3): 247-257.
- Delaval, K. and R. Feil. 2004. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting *Current Opinion in Genetics and Development*, 14(2): 188-195.
- Denis, H., M.N. Ndlovu and F. Fuks. 2011. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Reports*, 12: 647-656.
- Farias, L.C., C.A. De Carvalho Fraga, M.V.M. De Oliveira, T.F. Silva, L. Marques-Silva, P.R. Moreira and A.L.S. Guimarães. 2010. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *International Journal of Oncology*, 37(1): 167-176.
- Fan, H., D.S. Liu, S.H. Zhang, J.B. Hu, F. Zhang and Z.J. Zhao. 2008. DNMT3B 579 G>T promoter polymorphism and risk of esophagus carcinoma in Chinese. *World Journal of Gastroenterology*, 14(14): 2230.
- Golding, M.C., G.L. Williamson, T.K. Stroud, M.E. Westhusin and C.R. Long. 2011. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Molecular Reproduction and Development*, 78(5): 306-317.
- Feehey, A., E. Nilsson and M.K. Skinner. 2014. Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals. *Journal of animal science and biotechnology*, 5(1): 48-55.
- Goll, M.G. and T.H. Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74: 481-514.
- Guo, X., X. Liu, X. Xu, M. Wu, X. Zhang, Q. Li and Y. Yu. 2012. The expression levels of DNMT3a/3b and their relationship with meat quality in beef cattle. *Molecular Biology Reports*, 39: 5473-5479.
- Haggarty, P., G. Hoad, S.E. Harris, J.M. Starr, H.C. Fox, I.J. Deary and L.J. Whalley. 2010. Human intelligence and polymorphisms in the DNA methyltransferase genes involved in epigenetic marking. *PloS One*, 5(6): e11329.
- Haggarty, P., G. Hoad, G.W. Horgan, D.M. Campbell. 2010. DNA methyltransferase candidate polymorphisms, imprinting methylation, and birth outcome. *PloS One*, 8(7): e68896.
- Hayashi, K. and D.W. Yandell. 1993. How sensitive is PCR-SSCP?. *Human Mutation*, 2(5): 338-346.
- Johanson, J.M., P.J. Berger, S. Tsuruta and I. Misztal. 2011. A Bayesian threshold-linear model evaluation of perinatal mortality, dystocia, birth weight, and gestation length in a Holstein herd. *Journal of Dairy Science*, 94(1): 450-460.
- Kamei, Y., T. Suganami, T. Ehara, S. Kanai, K. Hayashi, Y. Yamamoto and Y. Ogawa. 2010. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. *Obesity*, 18: 314-321.
- Khatami, F., B. Noorinayer, S.R. Mohebi, S. Ghiasi, R. Mohebi, M. Hashemi and M. Zali. 2009. Effects of amino acid substitution polymorphisms of two DNA methyltransferases on susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 10: 1183-1188.
- Konstantinos, K.V., P. Panagiotis, V.T. Antonios, P. Agelos and N.V. Argiris. 2008. PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular biotechnology*, 38(2): 155-163.
- Kristensen, T.N., A.A. Hoffmann, C. Pertoldi and A.V. Stronen. 2015. What can livestock breeders learn from conservation genetics and vice versa? *Frontiers in genetics*, 6: 38-50.
- Kulis, M. and M. Esteller. 2010. DNA methylation and cancer. *Advances in Genetics*, 70: 27-56.
- Lan, X., E.C. Cretney, J. Kropp, K. Khateeb, M.A. Berg, F. Peñagaricano, R. Magness, A.E. Radunz and H. Khatib. 2013. Maternal diet during pregnancy induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. *Frontiers in genetics*, 4: 49.

- ۱۱۱
25. Liu, X., X.Y. Guo, X.Z. Xu, M. Wu, X. Zhang, Q. Li and C.H. Qin. 2012. Novel single nucleotide polymorphisms of the bovine methyltransferase 3b gene and their association with meat quality traits in beef cattle. *Genetics and Molecular Research*, 11: 2569-2577.
 26. Liu, X., T. Usman, Y. Wang, Z. Wang, X. Xu, M. Wu, Y. Zhang, X. Zhang, Q. Li, L. Liu and W. Shi. 2015. Polymorphisms in epigenetic and meat quality related genes in fourteen cattle breeds and association with beef quality and carcass traits. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(4): 467-475.
 27. Meijering, A. 1984. Dystocia and stillbirth in cattle-A review of causes, relations and implications *Livestock Production Science*, 11(2): 143-177.
 28. Mmerekole, F.U. and J.I. Obinne. 2010. Relationship of the body weight and linear measurements of the west African Dwarf (WAD) sheep under the humid environment of Nigeria. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 43(1): 64-67.
 29. Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99: 247-257.
 30. Olson, K.M., B.G. Cassell, A.J. McAllister and S.P. Washburn 2009. Dystocia, stillbirth, gestation length, and birth weight in Holstein, Jersey, and reciprocal crosses from a planned experiment. *Journal of Dairy Science*, 92(12): 6167-6175.
 31. Seidel, C.C. Florean, M. Schnekenburger, M. Dicato and M. Diederich. 2012. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. *Biochemistry*, 94: 2264-2279.
 32. Shariat, M., Gh.R. Dashab and M. Vafaye valleh. 2019. Comparison of evolutionary and phylogenetic processes of the nucleotide sequence of the hvr1 mitochondrial genome in goat and other animal species. *Journal of Animal Production Research*, 10(23): 133-143 (In Persian).
 33. Sunnucks, P., A.C.C. Wilson, L.B. Beheregaray, K. Zenger, J. French, and A.C. Taylor, 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular ecology*, 9(11): 1699-1710.
 34. Tian, F., F. Zhan, N.D. VanderKraats, J.F. Hiken, J.R. Edwards, H. Zhang, K. Zhao and J. Song. 2013. DNMT gene expression and methylome in Marek's disease resistant and susceptible chickens prior to and following infection by MDV. *Epigenetics*, 8(4): 431-444.
 35. Triantaphyllopoulos, K.A., I. Ikonomopoulos and A.J. Bannister. 2016. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. *Epigenetics and Chromatin*, 9(1): 31.
 36. Xiang, G., F. Zhenkun, C. Shuang, Z. Jie, Z. Hua, J. Wei, P. Da and L. Dianjun. 2010. Association of DNMT1 gene polymorphisms in exons with sporadic infiltrating ductal breast carcinoma among Chinese Han women in the Heilongjiang Province. *Clinical Breast Cancer*, 10: 373-377.
 37. Ye, C., A. Beeghly-Fadiel, W. Lu, J. Long, X.O. Shu, Y.T. Gao, W. Zheng and Q. Cai. 2010. Two-stage case-control study of DNMT-1 and DNMT-3B gene variants and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121: 765-769.
 38. Zhong, X., Y. Peng, C. Yao, Y. Qing, Q. Yang, X. Guo, W. Xie, M. Zhao, X. Cai and J.G. Zhou. 2016. Association of DNA methyltransferase polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis. *Biomedical Reports*, 5: 467-472.

PCR-SSCP Analysis of Genetic Variation in DNMT Gene Family in Holstein Cattle

Mehdi Vafaye Valleh¹ and Sajjad Shahdadi Sardo²

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran,

(Corresponding Author: Mehdi.Valleh@uoz.ac.ir)

2- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: April 13, 2019

Accepted: September 14, 2019

Abstract

Due to their roles in regulating embryonic growth and development members of DNA Methyltransferases (DNMTs) family have been shown to play fundamental parts in embryonic fertilization to postnatal life; through regulating the establishment and/or maintenance of specific epigenetic marks. The present study was conducted to identify potential reported mutations within the exon 33 of DNMT-1, introns 4 of DNMT-3a and introns 3 DNMT-3a genes and their relationship with birth weight in Iranian Holstein cows. A total of 60 blood samples from Holstein dairy cattle with records of weight from birth to adult age were randomly collected from industrial dairy cattle farm located in Kerman province. Genomic DNA samples was extracted using Phenol-Chloroform method and target sequence was amplified with PCR using specific primers. Polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) and silver nitrate staining methods was used for screening potential mutation in target sequences. According to results of this study, in all cases, no mutation in target sequence were identified as all samples had the same specific SSCP pattern with respect to their size. The lack of polymorphism may imply that these region may be attributable to a relative inefficiency of PCR-SSCP for mutation detection, small sample size, stochastic effects of genetic drift and/or conserved nature of these genes due to either natural or artificial selection. According to the results of this study, analyzed sequence may not be informative as molecular marker for birth weight in Holstein cattle.

Keyword: DNMTs, Genetic Variation, Iranian Holstein Cattles, PCR-SSCP